

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
GABRIELA SVIERDSOVSKI

ORGANOGENESE DE *Trichilia casaretti* C.DC., *Trichilia elegans* A.Juss. e
Trichilia pallida Sw (MELIACEAE)

CURITIBA

2020

GABRIELA SVIERDSOVSKI

ORGANOGENESE DE *Trichilia casaretti* C.DC., *Trichilia elegans* A.Juss. e
Trichilia pallida Sw (MELIACEAE)

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, Curso de Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Luciana Lopes Fortes Ribas

CURITIBA

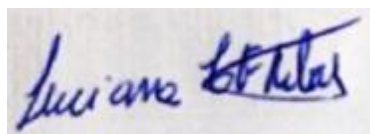
2020

TERMO DE APROVAÇÃO

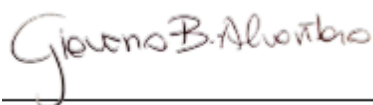
GABRIELA SVIERDSOVSKI

ORGANOGENESE DE *TRICHILIA CASARETTI* C.DC., *TRICHILIA ELEGANS* A.JUSS. E *TRICHILIA PALLIDA* SW (MELIACEAE)

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, pela seguinte banca examinadora:



Profa. Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas
Orientadora – Setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná



Profa. Dra. Giovana Bomfim de Alcantara
Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do
Paraná



Dra. Juliana Degenhardt Goldbach
Embrapa Florestas

Curitiba, 22 de dezembro de 2020

A meus pais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a meus pais, que sempre foram maravilhosos e me ensinaram o valor dos estudos acima de qualquer coisa. Foram meus melhores amigos e sempre estiveram ao meu lado.

Agradeço à minha irmã que mesmo longe neste momento da minha vida me apoiou e sempre me inspirou por sua determinação.

Também agradeço ao meu namorado e amigos que acreditaram em mim mesmo quando eu mesma já não acreditava. Agradeço por todas as vezes que me tiraram de toda a pressão sofrida neste momento com suas conversas leves e seus sorrisos acolhedores.

Por último, mas não menos importante, agradeço a minha orientadora Luciana Lopes Fortes Ribas que aceitou me orientar neste projeto, e o fez com muito carinho e paciência.

RESUMO

Trichilia casaretti, *Trichilia elegans* e *Trichilia pallida* são espécies nativas que apresentam potencial bioinseticida, além de serem boas opções para recuperação de áreas degradadas. Os estudos sobre sua propagação são inexistentes ou escassos. O objetivo deste estudo foi estabelecer culturas *in vitro* e induzir e regenerar brotos de *T. casaretti*, *T. elegans* e *T. pallida*. Explantes foliares, segmentos nodais e brotos apicais (1,0 – 1,5 cm) das três espécies foram coletados e submetidos à imersão em solução de 0,05% de cloreto de mercúrio e 0,1% de Tween 20, durante 10 minutos. Os explantes foram inoculados em meio de cultura de Murashige e Skoog, 1962 (MS). Os segmentos nodais e brotos apicais apresentaram porcentagens de sobrevivência superiores a 90% para *T. elegans* e *T. pallida* e acima de 60% para *T. casaretti*. A indução e regeneração de brotos foram avaliadas em meio MS, acrescido de BAP (0 a 4 μ M de BAP). Para a multiplicação de *T. elegans* e *T. pallida*, a adição de 2 μ M BAP ao meio MS aumentou o número de brotos, após primeiro subcultivo (3,23 e 4,33, respectivamente), mas não interferiu no comprimento médio da parte aérea. Os explantes caulinares de *T. casaretti* obtiveram melhor resposta, quando estabelecidos *in vitro* em meio contendo 4 μ M de BAP e transferidos para meio com 1 μ M de BAP no cultivo inicial (2,97). Foram estabelecidas culturas *in vitro*, com sucesso, para as três espécies testadas com a utilização de explantes de brotações apicais e segmentos nodais, enquanto que os foliares não foram responsivos. A adição de BAP estimulou a formação de novas brotações e a melhor concentração variou conforme a espécie. Com isso, constatou-se que são necessários mais estudos para aumentar a regeneração de brotos e concluir as outras etapas da propagação *in vitro*.

Palavras-chave: BAP; citocinina; micropropagação; potencial bioinseticida

ABSTRACT

Trichilia casaretti, *Trichilia elegans* and *Trichilia pallida* are native species that have potential bioinsecticide, in addition to being good alternatives for recovering degraded areas. Studies on its propagation are non-existent or scarce. The aim of this study was to establish in vitro cultures and to induce and regenerate shoots of *T. casaretti*, *T. elegans* or *T. pallida*. Leaf explants, nodal segments and apical shoots (1.0 - 1.5 cm) of the three species were collected and immersed in a solution of 0.05% mercury chloride, with 0.1% Tween 20, for 10 minutes. The explants were cultivated in Murashige and Skoog culture medium, 1962 (MS). The nodal segments and apical shoots achieved percentages of survival > 90% for *T. elegans* and *T. pallida* and > 60% for *T. casaretti*. Shoot induction and regeneration were evaluated in MS medium, supplemented with BAP (0 to 4 μ M BAP). For the multiplication of *T. elegans* and *T. pallida*, the addition of 2 μ M BAP to the MS medium increased the number of shoots, after the first subculture (3.23 and 4.33, respectively), but did not influence in the average length of the part aerial. The explants of *T. casaretti* achieved better response when in vitro establish in medium containing 4 μ M BAP and transferred to medium with 1 μ M BAP in the initial culture (2.97). In vitro cultures were successfully established for the three species tested with apical shoots and nodal segments, while the leaves were not responsive. The addition of BAP induced the new shoots regeneration and the best concentration varied according to the species. In conclusion, further studies to increase the regeneration of shoots and complete the other stages of in vitro propagation are necessary.

Keywords: BAP; cytokinin, micropropagation, insecticide potential

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – LISTA DE ARTIGOS SOBRE MICROPROPAGAÇÃO DE MELIACEAE.....	18
TABELA 2 – PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO MICROBIANA, DE SOBREVIVÊNCIA E RESPOSTA DE BROTAÇÕES DE <i>Trichilia elegans</i> , APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MS.....	28
TABELA 3 – PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO MICROBIANA, DE NECROSE, DE SOBREVIVÊNCIA E RESPOSTA DE BROTAÇÕES DE <i>Trichilia pallida</i> , APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MS.....	28
TABELA 4 – PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO MICROBIANA, DE NECROSE, DE SOBREVIVÊNCIA E RESPOSTA DE BROTAÇÕES DE <i>Trichilia casaretti</i> , APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MS COM 0, 1, 2 E 4 μ M DE BAP.....	29
TABELA 5 – NÚMERO E COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTOS DE <i>Trichilia elegans</i> , APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MS, SUPLEMENTADO COM 2 μ M BAP.....	30
TABELA 6 – NÚMERO E COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTOS DE <i>Trichilia pallida</i> , APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MS, SUPLEMENTADO COM 2 μ M BAP.....	30
TABELA 7 – NÚMERO E COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTOS DE <i>Trichilia casaretti</i> , APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MS, SUPLEMENTADO COM 1 μ M BAP.....	31
TABELA 8 – NÚMERO E COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTOS DE <i>Trichilia elegans</i> , APÓS 30 DIAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO, EM MEIO MS, SEM OU COM ADIÇÃO DE 1 E 2 μ M BAP.....	31

TABELA 9 – NÚMERO E COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTO DE *Trichilia pallida*, APÓS 30 DIAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO, EM MEIO MS, COM ADIÇÃO DE 2 µM BAP..... 32

TABELA 10 – NÚMERO E COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTO DE *Trichilia pallida*, APÓS 30 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO MS, SEM OU COM 1 µM DE BAP..... 32

TABELA 11 - NÚMERO E COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTO DE *Trichilia casaretti*, APÓS 30 DIAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO EM MEIO MS, COM ADIÇÃO DE 2 µM BAP..... 33

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AIB – ácido indolil-3-butírico

ANA – ácido α-naftalenoacético

BAP – 6-benzilaminopurina

HgCl₂ – cloreto de mercúrio

MS – Murashige e Skoog (1962)

PPM – “Plant Preservative Mixture”

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	9
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	<i>Trichilia casaretti</i> C.DC.	12
2.2	<i>Trichilia elegans</i> A. Juss.	13
2.3	<i>Trichilia pallida</i> Sw.	14
2.4	MICROPROPAGAÇÃO	16
2.4.1	Micropropagação de Meliaceae	17
4.1.2	Meio de cultura	19
3.	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL.....	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1	MATERIAL VEGETAL	23
4.2	COLETA DOS EXPLANTES E DESINFESTAÇÃO	24
4.3	ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS <i>IN VITRO</i>	24
4.4	INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES.....	25
4.5	MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	26
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5.	RESULTADOS	28
5.1	DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i>	28
5.2	INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DE BROTOS	29
6.	DISCUSSÃO	34
7.	CONCLUSÕES	39
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
	REFERÊNCIAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Trichillia* P. Browne pertence à família Meliaceae e é constituído de 103 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, Central e África (PENNINGTON; CLARKSON, 2015). Segundo dados da Flora do Brasil (2020), 53 espécies de *Trichillia* podem ser encontradas no Brasil, sendo que 17 destas são endêmicas.

Trichillia casaretti C. DC é uma espécie nativa e endêmica do Brasil. *Trichillia elegans* A. Juss. e *Trichillia pallida* Sw. também são espécies nativas, porém não endêmicas do Brasil. Essas espécies são arbustos ou árvores que ocorrem na Mata Atlântica e entre outros domínios fitogeográficos (FLORA DO BRASIL, 2020 em construção). As espécies deste gênero são encontradas principalmente em florestas tropicais de terras baixas, florestas montanas e sazonalmente em florestas secas, onde ocupam o extrato baixo e médio da comunidade vegetal (PENNINGTON, 2016; FLORA DO BRASIL em construção, 2020). Dentre as espécies estudadas, *T. casaretti* foi considerada como espécie vulnerável da Lista vermelha da Flora Brasileira (CNCFlora, 2012), enquanto que as outras espécies ainda não foram avaliadas quanto à ameaça de extinção (PENNINGTON, 2016; FLORA DO BRASIL em construção, 2020).

Comercialmente, alguns gêneros da família Meliaceae são extremamente apreciados pela qualidade de sua madeira. Entretanto, os troncos de algumas espécies de *Trichillia* possuem poucas dimensões e por isso são pouco explorados pela indústria madeireira (LORENZI, 2009). O maior interesse econômico pelo gênero reside no potencial inseticida que os extratos de folhas e ramos demonstraram na eliminação de pragas de importantes culturas alimentícias como o milho, tomate e erva-mate (SOUZA; VENDRAMIN, 2001; BORGONI; VENDRAMIN, 2005; ALBANESE, 2010; BARZOTTO, 2010; PITA et al., 2011). A investigação dos compostos ativos biológicos presentes no gênero apontou-o também como um antimicrobiano em potencial (PARITALA et al., 2015). Além disso, as espécies de *Trichillia* podem ser boas opções para a recuperação de áreas degradadas ou adensamento de matas, pois são plantas pioneiras à secundárias e seus frutos são intensamente consumidos por diversas espécies de aves (LORENZI, 1992; 2009).

Os frutos de *Trichilia* contêm de uma a três sementes que são recobertas total ou parcialmente por um arilo carnosos de coloração vermelha à alaranjada (PATRÍCIO e CERVI; 2005). Este arilo acaba dificultando a germinação das sementes por atrair aves e roedores e também favorecer a contaminação por fungos (VALMORBIDA, 2007). Segundo Zimbach et al. (2015), *T. pallida* é uma espécie recalcitrante, de embrião imaturo e por apresentar essas características dificulta a coleta e conservação de suas sementes, uma vez que estas não suportam o dessecamento. Valmorbida et al. (2008) revelaram em estudo de propagação sexuada de outra espécie, *T. catigua* A. Juss., que a produção de sementes era irregular, isto é, a produção é normal em um ano e no ano seguinte sofre uma diminuição ou ausência. A propagação por estaquia desta espécie apresentou pouca resposta de enraizamento (41,67%), com o uso de 5 000 mg L⁻¹ de ácido indol-3-butírico (AIB).

Micropropagação envolve técnicas de cultura de tecidos utilizadas para cultivar células, tecidos e órgãos, em condições assépticas, visando regenerar e propagar plantas (ILIEV et al., 2010). Essas técnicas apresentam vantagens quando comparadas com os métodos de propagação tradicionais, podendo ser uma alternativa eficiente para as espécies de *Trichilia*. Estudos de propagação com espécies do gênero *Trichilia* são escassos, devido às características morfofisiológicas citadas anteriormente, que evidenciam uma dificuldade em propagar sexualmente e vegetativamente. Prim et al. (2020) estabeleceram um protocolo de micropropagação para *T. pallida*, a partir de sementes germinadas *in vitro* e *ex vitro*, enquanto que, para *T. casaretti* e *T. elegans* ainda não existem estudos. Neste sentido, as técnicas de cultura de tecidos vegetais vêm sendo empregadas com sucesso como alternativas para propagação de espécies de difícil reprodução. Este procedimento permite a produção massal de plantas, favorecendo a manutenção de espécies em vias de extinção, como *T. casaretti* (OSEN et al., 2018).

Tendo em vista a escassez de estudos sobre a micropropagação do gênero aliada à dificuldade de propagação, tanto sexuada como vegetativa, que estas espécies apresentam, este estudo teve como objetivo o estabelecimento de culturas *in vitro* e regeneração de brotos de *T. casaretti*, *T. elegans* e *T. pallida* para posteriormente estabelecer um protocolo de

micropropagação. Foi realizada uma revisão bibliográfica sobre micropropagação de Meliaceae que auxiliou no entendimento das respostas obtidas *in vitro* e servirá de suporte para instalação de novos experimentos visando a conclusão do protocolo de produção de mudas de *T. casaretti*, *T. elegans* e *T. pallida*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Trichilia casaretti* C.DC.

T. casaretti é conhecida popularmente como murta-vermelha, baga-de-morcego (SC), catiguá-branco (RS), catiguá (PR, SC, RS) (KLEIN, 1984) e orvalho (MG) (PATRÍCIO; CERVI, 2005; LORENZI, 2009).

É uma espécie arbórea, terrícola que pode atingir até 10 metros de comprimento. Seus frutos são cápsulas, com 1-3 sementes ovaladas, de testa membranácea e recobertas parcialmente por um arilo vermelho-alaranjado (PATRÍCIO; CERVI, 2005; LORENZI, 2009; PENNINGTON, 2016).

Classificada pela Flora do Brasil (2020) como endêmica e pelo CNCFlora (2012) como espécie vulnerável da Lista Vermelha da Flora Brasileira, distribui-se desde o sul da Bahia até o norte do Rio Grande do Sul pelas várzeas úmidas da Floresta Ombrófila Densa Submontana, Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Semidecidual (PATRÍCIO; CERVI, 2005; LORENZI, 2009; PENNINGTON, 2016). Nos domínios fitoecológicos ocupados por ela, apresenta-se de maneira descontínua e possui inexpressiva dispersão, crescendo principalmente no interior de matas primárias (LORENZI, 2009).

Devido às dimensões reduzidas da sua madeira, esta espécie só é empregada na fabricação de embalagens e brinquedos. Porém, seu plantio é recomendado para a arborização urbana e reflorestamentos mistos, pois seu porte é pequeno e seus frutos servem como alimento para a fauna (LORENZI, 2009). Outra utilidade desta espécie é no controle biológico da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), principal praga do milho. Borgoni e Vendramim (2005) demonstraram a eficiência do extrato das folhas de *T. casaretti* em aumentar a mortalidade de larvas em estágio final da lagarta.

Sua floração ocorre nos meses de dezembro a fevereiro e a coleta de frutos maduros pode ser feita nos meses de abril a setembro (PATRÍCIO e CERVI, 2005) e nos meses de março a maio (LORENZI, 2009). Com relação à produção de mudas desta espécie, Lorenzi (2009) recomendou a germinação de sementes logo após a coleta, em canteiros, contendo substrato organo-argiloso, abrigadas a meia-sombra e com irrigação duas vezes ao dia. No

entanto, apesar dessas recomendações, a germinação obtida foi abaixo de 50% e apresenta desenvolvimento lento no campo.

Os estudos sobre *T. casaretti* são raros. A espécie é citada em livros sobre a flora brasileira ou em pesquisas sobre distribuição, taxonomia e diversidade ecológica. Não existem relatos sobre a propagação vegetativa.

2.2 *Trichilia elegans* A. Juss.

Esta espécie é conhecida vulgarmente como pau-de-ervilha (SC, RS), catiguá (PR, SC, RS), erva-de-cutia (SC) (KLEIN, 1984), caferama (PR, Cornélio Procópio) (PATRÍCIO e CERVI, 2005) e canela-do-mato (PASTORE, 2003).

Apesar de ser dividida em duas subespécies: *T. elegans* A. Juss. subsp. *elegans* e *T. elegans* A. Juss. subsp. *richardiana*, este trabalho tratará a espécie estudada como pertencente a subespécie *elegans*, devido às características de suas folhas listadas na chave de identificação das subespécies de *T. elegans* de Pennington (2016). Além disso, a subespécie *richardiana* tem sua distribuição mais austral nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, não apresentando nenhum registro no estado do Paraná (PASTORE, 2003; PATRÍCIO e CERVI, 2005; PENNINGTON, 2016).

Os indivíduos adultos desta espécie são arvoretas, com 2 a 7 metros de altura, terrícolas e de sub-bosque, que se distribuem por quase todos os domínios fitogeográficos brasileiros, estando ausente no Nordeste (PATRÍCIO e CERVI, 2005; ROSSETO, 2007; CNCFlora, 2020). É uma espécie não endêmica, que além de ocupar o sul do Brasil estende-se até a região noroeste da América do Sul, distribuindo-se ao longo da bacia Amazônica (PENNINGTON, 2016). É recomendada para a regeneração de fragmentos da Floresta Estacional Decidual, onde apresenta grande potencial para a perpetuação desta floresta, pois encontra-se de forma abundante no banco de plântulas e na regeneração natural estabelecida (SCCOTI et al., 2011).

Os frutos de *T. elegans* podem ser coletados de janeiro a julho e/ou de outubro a dezembro (PASTORE, 2003) ou ainda de maio a agosto no estado do Paraná (PATRÍCIO e CERVI, 2005). Possui de 1-3 sementes de formato elipsoide, plano-convexo ou trígono, de testa lisa, negra e brilhante e com arilo

carnoso e lobulado de coloração vermelha-alaranjada envolvendo a porção apical da semente (PATRÍCIO e CERVI, 2005).

A propagação sexuada via germinação de sementes pode ser um problema para *T. elegans* uma vez que Scoti et al. (2011) não encontraram nenhuma semente da espécie no banco de sementes do solo de um fragmento de Floresta Estacional Decidual. Essa falta de sementes de *T. elegans* no solo da floresta pode estar relacionada com a sazonalidade da sua produção e/ou com a perda de viabilidade destas no solo.

As sementes de *T. elegans* podem tornar-se inviáveis devido a contaminações por microrganismos pela presença de arilo na semente, como relatado por Campos (2007) para *T. pallida*. Além da propagação sexuada via germinação de sementes, que são dispersas na serapilheira por aves frugívoras, Rosseto (2007) verificou em estudo de um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual e de Mata Ombrófila que *T. elegans* apresenta crescimento clonal, constatando a ligação subterrânea entre indivíduos da espécie até 3 cm de profundidade. Não foi relatado nenhum estudo sobre a propagação *in vitro* de *T. elegans*.

As pesquisas com esta espécie concentram-se, principalmente, na verificação dos efeitos bioinseticidas de seus extratos vegetais sobre diversas espécies de pragas da agricultura, e na caracterização dos compostos ativos presentes nestes extratos (GARCEZ et al., 2000; BORGONI e VENDRAMIN, 2005; MATOS et al., 2009).

2.3 *Trichilia pallida* Sw.

Os nomes populares dessa espécie no território brasileiro são: catiguá, marinheiro, peito-de-pombo (PASTORE, 2003), baga-de-morcego (SC), catiguá-gráudo, taúva (PR) e amesca (MG) (PATRÍCIO e CERVI, 2005).

T. pallida é uma espécie arbórea, com altura entre 3 e 8 metros e de hábito terrícola, amplamente dispersa pela América do Sul e sul da América Central (PENNINGTON, 2016; CNCFlora, 2020). No Brasil, essa espécie tem representantes desde a Amazônia até o Paraná, ocupando, principalmente, as Florestas Estacionais Semidecíduais. Encontra-se também em Matas Ciliares, Florestas Paludosas e raramente em Florestas Ombrófilas (PASTORE, 2003;

ROSSETO, 2007). Segundo Rosseto (2007), o fato de ser a única espécie do gênero a crescer em Florestas Paludosas acredita-se que ela seja fisiologicamente tolerante a níveis altos de umidade do solo.

Em levantamento florestal de um fragmento da Floresta Atlântica realizado por Peloso (2012), *T. pallida* está entre as 10 espécies de maior valor de importância para esta comunidade. Este índice sugere a relevância da espécie na composição desta comunidade vegetal e justifica seu uso na recuperação de áreas degradadas de Floresta Atlântica.

A espécie floresce no estado do Paraná, de janeiro a junho e a coleta de frutos maduros pode ser realizada a partir de maio (PATRICIO e CERVI, 2005). Seus frutos secos e deiscentes geralmente apresentam sementes únicas e esféricas (PASTORE, 2003; PENNINGTON, 2016), mas também podem ocorrer cápsulas com até duas sementes por lóculo, com forma plano-convexa (PATRICIO e CERVI, 2005; PENNINGTON, 2016).

A semente possui testa lisa e brilhante de coloração marrom-escuro a avermelhada e está parcialmente recoberta por um arilo carnoso de cor alaranjada (PATRICIO e CERVI, 2005). O arilo ajuda na dispersão zoocórica da semente, pois atrai os animais dispersores (TAKAHASI e FINA, 2004). Entretanto, a sua presença aumenta a possibilidade de contaminação por fungos, inviabilizando-a (CAMPOS, 2007). Zimback et al. (2015) caracterizaram as suas sementes como recalcitrantes, isso quer dizer que elas não toleram dessecação e em ambiente natural são dispersas com alto grau de umidade. As sementes recalcitrantes representam um desafio, primeiramente em como assegurar sua umidade durante o transporte e posteriormente em como armazená-las, sob condições de umidade que mantenham a viabilidade do embrião, sem que haja contaminação por microrganismos (FONSECA; FREIRE, 2003). Devido à recalcitrância das sementes, estudos sobre micropropagação da espécie são relevantes, uma vez que esta técnica não implica em armazenamento destas para germinação, pois utiliza tecidos já diferenciados da planta matriz para obter um novo indivíduo.

Prim et al. (2020) estabeleceram um protocolo completo para micropropagação de *T. pallida* utilizando segmentos cotiledonares e apicais de mudas obtidas por germinação de sementes *in vitro* e *ex vitro* mantidas em casa de vegetação. Os melhores resultados de regeneração de brotos (98% e

sete brotos por explante) foram obtidos em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 2 μ M de 6-benzilaminopurina (BAP). O enraizamento foi recomendado utilizando o meio MS/2 (MS, com a concentração de sais reduzida pela metade), adicionado de 5 μ M de ácido indol-3-butírico (AIB) e o transplante foi eficiente (87,76% de sobrevivência), após 90 dias de aclimatização em casa de vegetação.

A maioria das pesquisas encontradas com *T. pallida* se referem ao potencial do extrato de suas folhas e ramos no combate a diversas espécies de insetos-praga, mostrando bons resultados com lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) (BORGONI e VENDRAMIN, 2005), afídeos (*Rhopalosiphum maidis*) (PITA et al., 2011), mosca-branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) (SOUZA e VENDRAMIN, 2001), gorgulho-do-milho (*Sitophilus zeamais*) (ALBANESE, 2010) e ampola-de-erva-mate (*Gyropsylla spegazziniana*) (BARZOTTO, 2010).

2.4 MICROPROPAGAÇÃO

Micropropagação é um tipo de propagação vegetativa, conduzida sob condições assépticas e controladas, em um microambiente do frasco de cultivo, no qual tem todas as exigências de crescimento de uma planta (GUPTA et al., 2020).

A micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* se refere às técnicas de cultura de tecidos vegetais já bastante utilizadas comercialmente pela agricultura e horticultura e que também vêm sendo empregadas na área ambiental (RODRIGUEZ; VENDRAME, 2003) como alternativas viáveis para propagação massal de espécies ecologicamente importantes, ameaçadas ou de difícil propagação no campo incrementando os programas de conservação de germoplasma, melhoramento genético, recuperação de áreas degradadas e plantio homogêneo (RODRIGUEZ; VENDRAME, 2003; OLIVEIRA et al., 2013; ARAGÃO et al., 2015).

As técnicas de micropropagação são: I) proliferação de gemas axilares, II) indução de gemas adventícias por organogênese, de origem direta ou indireta (passando pela formação de calo), e III) multiplicação por meio de embriogênese somática (XAVIER et al., 2013). Para a micropropagação

comercial de espécies florestais, a rota preferencial é a de indução de gemas axilares, uma vez que esse processo ocorre de maneira espontânea na natureza, sendo mais seguro e fácil de controlar em laboratório, além de mostrar-se geneticamente mais estável (OLIVEIRA et al. 2013; RAM et al, 2014).

2.4.1 Micropropagação de Meliaceae

Diversos estudos sobre micropropagação de Meliaceae foram publicados a partir dos anos 1980. A Tabela 1 apresenta uma relação dos artigos encontrados sobre o tema, apresentando a espécie, a técnica de micropropagação e o tipo de explante utilizado.

Protocolos eficientes de micropropagação para *A. excelsa* (LIEW e TEO, 1998), *A. indica* (RODRIGUES et al., 2011), *C. montana* (BASTO et al., 2012), *C. odorata* (GARCÍA-GONZALES et al., 2011), *K. ivorensis* (HALIZA et al., 2014), *K. senegalensis* (HUNG e TRUEMAN, 2011), *M. dubia* (RAM et al., 2014), *M. azedarach* (VILA et al., 2002; HUSAIN e ANIS, 2009) e *T. pallida* (PRIM et al., 2020) foram desenvolvidos a partir da indução de gemas axilares utilizando segmentos do caule. Outros protocolos eficientes foram desenvolvidos por meio da indução de gemas adventícias utilizando raízes para *A. indica* (ARORA et al., 2011) e pecíolo para *T. ciliata* (DAQUINTA et al., 2005).

O sucesso na propagação *in vitro* é dependente de diversos fatores ambientais e fisiológicos. Um deles é escolha adequada do tipo de explante que depende do objetivo desejado, da espécie, da disponibilidade de material vegetativo e da estrutura de propagação disponível (XAVIER et. al. 2013).

Estudos com o objetivo de investigar possíveis diferenças nas respostas morfofisiológicas desenvolvidas por diferentes tipos de explantes foram conduzidos utilizando segmentos cotiledonares e apicais (BASTOS et al., 2012; ARAGÃO et al., 2016; PRIM et al., 2020). Diferenças entre os tipos de segmentos de *C. fissilis* em meio MS, com adição de 20 g L⁻¹ sacarose e 2,5 µM BAP foram observadas por Aragão et al. (2016). Os segmentos apicais apresentaram maior número de brotos (~2,0), enquanto os segmentos cotiledonares eram mais longos e vigorosos.

TABELA 1 – LISTA DE ARTIGOS SOBRE MICROPROPAGAÇÃO DE MELIACEAE.

ESPÉCIE	NOME-VULGAR	ROTA DE MICROPROPAGAÇÃO	EXPLANTE	AUTOR/ANO
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	Nim	Indução gemas adventícias	Raiz	ARORA et al., 2011
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	Nim	Proliferação de gemas axilares	Segmentos nodais	RODRIGUES et al., 2011
<i>Cabralea canjerana</i> (Vell.) Mart.	canjerana	Proliferação de gemas axilares	Segmentos nodais	ROCHA et. al., 2007
<i>Cedrela fissilis</i> Vell.	cedro-rosa	Proliferação de gemas axilares	Segmentos apicais e nodais	ARAGÃO et al., 2016
<i>Cedrela montana</i> Moritz ex Turcz	-	Proliferação de gemas axilares e indução de gemas adventícias	Broto, folhas, nós, entrenós e pecíolos	BASTO et al., 2012
<i>Cedrela odorata</i> L.	cedro-espanhol	Proliferação de gemas axilares	Segmentos nodais	FLORES et al., 2012
<i>Khaya ivorensis</i> A. Chev.	mogno-africano	Proliferação de gemas axilares	Segmentos apicais e nodais	HALIZA et al. 2014
<i>Khaya senegalensis</i> A. Juss.	mogno-africano	Proliferação de gemas axilares	Broto	HUNG; TRUEMAN, 2011
<i>Melia dubia</i> Cav.	-	Proliferação de gemas axilares	Segmentos nodais	RAM et al., 2014
<i>Melia azedarach</i> L.	cinamomo	Proliferação de gemas axilares	Segmentos nodais	HUSAIN; ANIS, 2009
<i>Swietenia macrophylla</i> King.	mogno-brasileiro	Proliferação de gemas axilares	Segmentos nodais	PATÍÑO et al., 2013
<i>Toona ciliata</i> M. Roem.	cedro-australiano	Indução de gemas adventícias	Folhas	DAQUINTA et al., 2000
<i>Trichilia pallida</i> Swartz.	Catiguá	Proliferação de gemas axilares	Segmentos apicais e nodais	PRIM et al., 2020

FONTE: A autora (2020).

Os segmentos apicais e cotiledonares de *T. pallida* foram cultivados em meio MS, suplementado com diferentes concentrações de BAP (0, 2, 4 e 8 μ M). Os resultados indicaram que a adição de BAP promoveu um aumento na formação de brotos laterais atingindo o maior número de brotos (7,0) com a concentração de 2 μ M, no segundo subcultivo (PRIM et al., 2020). Resultado semelhante foi obtido por Ram et al. (2014) no cultivo *in vitro* de segmentos

nodais de *M. dubia*, com taxa de multiplicação de 4,92 obtida em meio MS, com adição de 2,22 μM de BAP.

Bastos et al. (2012) testaram diversos tipos de explantes, sendo que foi estabelecido um protocolo de micropropagação viável apenas para os segmentos nodais de matrizes juvenis, cultivados em meio MS/3 (MS, com os sais reduzidos a 1/3). Os segmentos desenvolveram brotos axilares em 45,8% dos explantes e 56,2% apresentaram enraizamento espontâneo, sem adição de reguladores vegetais. Os brotos alongados produziram brotos adventícios (50%) com a adição de 0,5 μM BAP e 0,5 μM de ácido α -naftalenoacético (ANA) e 20% enraizaram com suplementação de 0,5 μM ANA. As folhas cultivadas *in vitro* não responderam a nenhum dos tratamentos empregados, mesmo com a suplementação de tidiazuron (TDZ) ao meio de cultura. Os pecíolos formaram calos (3,9%) em meio com 13,3 μM BAP e 5 μM ANA e em 22% dos explantes de entrenós com uma concentração maior dos mesmos reguladores, porém não ocorreu a formação de brotos nem em pecíolos e nem nos entrenós.

Daquinta et al. (2005) obtiveram formação de brotos a partir de calos (44,5%) de pecíolos de *T. ciliata*, cultivados em meio MS suplementado com 0,25 μM de TDZ, após seis meses de cultivo. Os brotos foram mantidos nos frascos no escuro até a fase de alongamento e completaram o seu desenvolvimento em meio MS, contendo 4,4 μM de AIB, na presença de luz.

4.1.2 Meio de cultura

Além do tipo de explante, a composição do meio de cultura é de grande importância, pois fornece as substâncias essenciais para o desenvolvimento dos explantes, influenciando em suas respostas morfofisiológicas *in vitro* (ALMEIDA et al., 2012; PRIM et al., 2020).

O meio MS vem apresentando os melhores resultados para a micropropagação de Meliaceae, embora outros meios de cultura como WPM ("wood plant medium", LLOYD; MC COWN, 1981), JADS (CORREIA et al., 1995) e B5 (GAMBORG et al., 1968) foram mais eficientes para a propagação de outras espécies lenhosas (FLORES et al., 2011; BASSEGIO et al., 2017). Os resultados obtidos por Rocha et al. (2007), Rodrigues et al. (2011) e Haliza

et al. (2014) corroboram com a superioridade do meio MS na propagação de Meliaceae, ao comparar diferentes meios para a micropropagação.

Rocha et al. (2007) ao compararem as taxas de multiplicação dos explantes de *C. canjerana*, cultivados em meios MS e WPM, suplementados com 2,5 μM de BAP obtiveram 1,77 e 1,12 respectivamente, no segundo subcultivo. Haliza et al. (2014) compararam os meios MS, WPM e B5 e indicaram o meio MS, acrescido de 10 μM de BAP para o estabelecimento das culturas (3,4 brotos) e MS contendo 4,4 μM BAP para a multiplicação (3,5) de *K. ivorensis*. Resultado favorável ao MS também foi relatado por Rodrigues et al. (2011) na micropropagação de *A. indica*, com o maior número médio de brotos obtido com o meio MS ($\sim 1,7$), seguido do WPM ($\sim 1,0$) e do JADS ($\sim 0,8$).

2.4.1.3 Reguladores vegetais

Um dos grandes desafios da micropropagação é a seleção do balanço entre os reguladores de crescimento para estimular o crescimento e desenvolvimento dos explantes (OLIVEIRA et al., 2013). Diversas citocininas e auxinas podem ser utilizadas de acordo com o objetivo proposto. BAP é a citocinina mais utilizada para induzir a multiplicação de brotos de diversas espécies.

Combinações entre diferentes citocininas ou entre citocininas e auxinas também podem promover resultados positivos para algumas espécies. Para a etapa de iniciação do cultivo *in vitro* de *M. dubia*, a melhor resposta ocorreu com a combinação de 2,22 μM de BAP e 0,54 μM ANA (90% de explantes com brotos e comprimento médio de 2,80 cm), enquanto que essa concentração de BAP sozinha induziu 85,03% de explantes com brotos e o comprimento médio de 1,97 cm (RAM et al., 2014). A adição de 5 μM BAP e 0,5 μM AIA promoveu 90% de porcentagem de brotos e comprimento médio de 3,6 cm na etapa de multiplicação de *M. azedarach*. O número médio de brotos, com essa combinação de BAP e AIA (14,3) foi maior do que o obtido só com BAP (9,4). A combinação de 5 μM BAP e 0,5 μM ANA testada para explantes de *M. dubia* resultou em 60% dos explantes com brotos, número médio de 7,0 e comprimento médio de 2,8 cm (HUSAIN et al., 2009). Estes resultados

demonstraram a especificidade que há nas respostas morfofisiológicas para cada espécie.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Estabelecer um protocolo eficiente para regeneração de brotos de *T. casaretti*, *T. elegans* e *T. pallida*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um levantamento bibliográfico sobre micropropagação de Meliaceae;
- Testar qual o melhor tipo de explante entre: segmentos de pecíolos, do limbo foliar e segmentos caulinares apicais ou nodais e
- Verificar qual a melhor concentração de BAP para a regeneração de brotos das três espécies.

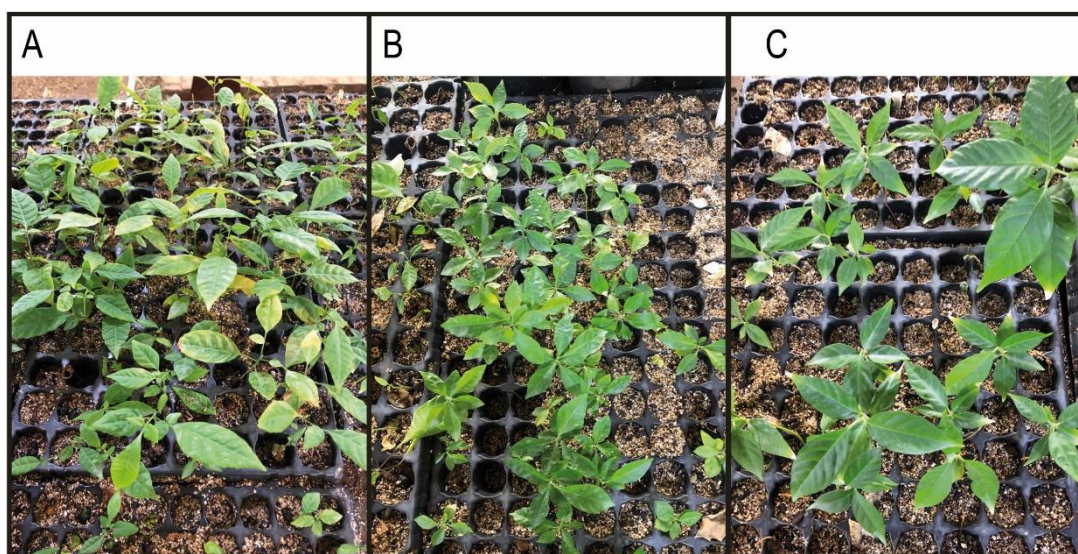
4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micropropagação Vegetal, situado no Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

4.1 MATERIAL VEGETAL

As plantas matrizes foram obtidas por germinação *ex vitro* e transplantadas em bandejas de polipropileno com 200 células (2 cm de diâmetro por célula) com vermiculita de granulometria fina Eucatex® e Plantmax Floresta® (1:3) (FIGURA 1). As matrizes foram mantidas em casa de vegetação durante seis meses, com temperatura média de $18 \pm 3^{\circ}\text{C}$, máxima de $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e mínima de $15 \pm 3^{\circ}\text{C}$, iluminação fornecida por lâmpadas de vapor de mercúrio (250 W), e com intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas. As plantas foram pulverizadas com 1 g L^{-1} do fungicida Cercobin®, uma vez por semana durante os seis meses e 24 horas antes da coleta dos explantes.

FIGURA 1 – PLANTAS MATRIZES A) *Trichilia casaretti*, B) *Trichilia elegans* e C) *Trichilia pallida*, APÓS SEIS MESES DA GERMINAÇÃO *EX VITRO* E MANTIDAS EM CASA DE VEGETAÇÃO.



Fonte: A autora (2020).

4.2 COLETA DOS EXPLANTES E DESINFESTAÇÃO

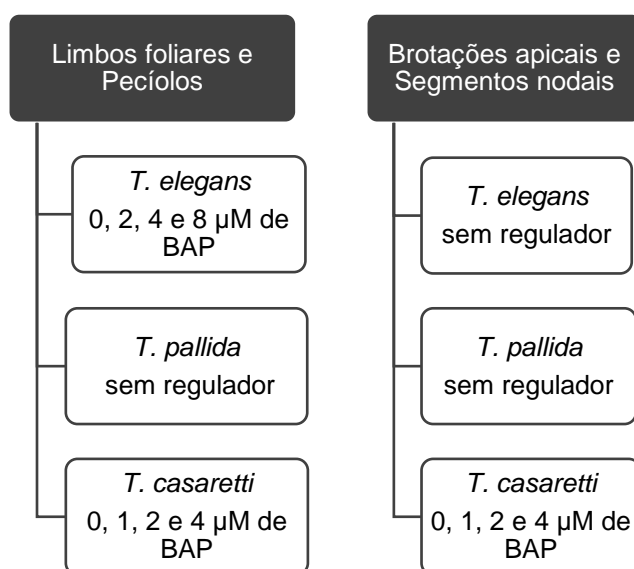
Os segmentos caulinares apicais e nodais (1,0 – 1,5 cm de comprimento), explantes do limbo foliar (0,5 x 0,5 cm) e pecíolo (0,5 - 1,0 cm) de *T. casaretti*, *T. elegans* e *T. pallida* foram coletados, lavados com detergente comercial durante 15 minutos, seguido de seis lavagens com água. Em seguida, em capela de fluxo laminar, os explantes foram imersos em solução com cloreto de mercúrio (HgCl₂) na concentração de 0,05%, acrescida de 0,1% de Tween 20, durante 10 minutos em suave agitação, seguido por seis enxágues em água destilada esterilizada.

A avaliação da porcentagem de contaminação por fungos, por bactérias, de necrose e de sobrevivência foi calculada após 30 dias de cultivo.

4.3 ESTABELECIMENTO DAS CULTURAS *IN VITRO*

Os explantes sobreviventes (brotações apicais e segmentos caulinares), medindo aproximadamente 1,0 cm de comprimento foram cultivados em meio MS, com adição ou não de BAP e as concentrações variaram conforme a espécie (Figura 2).

FIGURA 2 – ESQUEMA DO TIPO DE EXPLANTE E DAS CONCENTRAÇÕES DE BAP UTILIZADAS NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE *Trichilia elegans*, *Trichilia pallida* e *Trichilia casaretti*.



4.4 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DE BROTAÇÕES

Explantos do limbo foliar e do pecíolo das três espécies foram cultivados individualmente em meio MS com 0, 1, 2 e 4 μM de BAP, por um período de até 120 dias. Cada tratamento foi constituído de 10 explantes e quatro repetições.

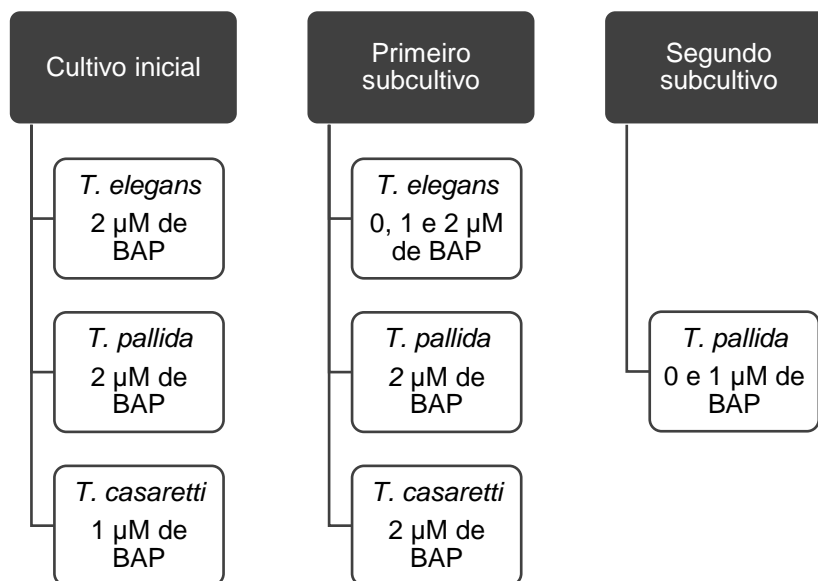
Os explantes caulinares de *T. pallida* e *T. elegans* foram cultivados em meio MS, suplementado com 2 μM de BAP (Figura 3). Para *T. pallida* foram colocados quatro brotos apicais por frasco e seis ou sete repetições, respectivamente, no cultivo inicial e primeiro subcultivo, enquanto que para os segmentos caulinares, foram realizadas três repetições com quatro explantes. No segundo subcultivo, os explantes foram cultivados em meio sem adição ou com 1 μM de BAP. Foram colocados quatro explantes por frasco e oito repetições nos meios sem adição de BAP e sete repetições para o meio com adição de 1 μM de BAP.

Para o cultivo inicial de *T. elegans* foram colocados seis explantes por frasco, com oito repetições para os brotos apicais e sete repetições para os segmentos caulinares. No primeiro subcultivo, foram comparados os explantes em meio sem adição e com 1 ou 2 μM de BAP. Foram colocados seis brotos por frasco e cinco repetições.

Os explantes de *T. casaretti* foram estabelecidos *in vitro* em meio com adição de BAP: 0, 1, 2 e 4 μM e no cultivo inicial foram transferidos para meio com 1 μM de BAP (Figura 3). Foram colocados cinco brotos apicais por frasco e três repetições por tratamento. Para os segmentos nodais, também foram cultivados cinco explantes por frasco e três repetições, com exceção do tratamento com 1 μM de BAP que foi constituído de cinco repetições. No primeiro e segundo subcultivo, os explantes foram transferidos para meio contendo 2 μM de BAP. Foram colocados cinco explantes por frasco e seis repetições por tratamento.

A avaliação do cultivo inicial e dos subcultivos das três espécies foi realizada a cada 30 dias, considerando as seguintes variáveis: número médio de brotos por explante, comprimento médio da parte aérea e porcentagem de necrose.

FIGURA 3 – ESQUEMA DAS CONCENTRAÇÕES DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) UTILIZADAS NA MULTIPLICAÇÃO DE BROTAÇÕES APICAIS E SEGMENTOS NODAIS PARA *Trichilia elegans*, *Trichilia pallida* e *Trichilia casaretti*.



4.5 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

O meio de cultura utilizado foi o de Murashige e Skoog (1962) (MS) semi-sólido, suplementado com 5,4 g L⁻¹ de ágar Himedia®, 1 ml L⁻¹ de PPM ("Plant Preservative Mixture") e 3% de sacarose. Para a etapa de estabelecimento *in vitro* de *T. pallida* e *T. elegans*, o meio de cultura não foi suplementado com regulador vegetal e para *T. casaretti* foi adicionada BAP (0, 1, 2 e 4 µM). Para a etapa de indução e regeneração de brotos das três espécies, o meio MS foi suplementado com 0 a 2 µM de BAP.

O pH dos meios de cultura foi ajustado entre 5,7 – 5,8, com HCl ou NaOH 1 N, antes da autoclavagem. Os meios foram distribuídos em tubos de ensaio (20 x 100 mm, 10 ml) para etapa de estabelecimento *in vitro* ou frascos (60 x 100 mm, 40 ml) para indução e regeneração de brotos. Os tubos e frascos foram fechados com tampas de polipropileno e posteriormente, autoclavados a 121 °C por 20 minutos a 1,06 kg cm⁻² de pressão.

Os procedimentos de instalação de culturas *in vitro* e subcultivos para meio de regeneração de brotações foram realizados em capela de fluxo laminar, com o auxílio de pinças e bisturis e o uso de esterilizador elétrico. Os explantes foram inoculados individualmente nos tubos de ensaio na etapa de estabelecimento de culturas *in vitro* ou com cinco ou seis explantes por frasco

para a fase de multiplicação. Os tubos e frascos contendo os explantes foram vedados com plástico filme. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas tubo de led Empalux® (20 W, luz branca 6.500 K) e fotoperíodo de 16 horas. Na fase de estabelecimento *in vitro*, os explantes caulinares foram mantidos 14 dias no escuro antes de serem expostos à luz. Os explantes foliares foram cultivados no escuro por períodos que variaram entre 21 a 120 dias.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos a análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($P < 0,05$) e análise de homogeneidade de variâncias pelos testes F ou Bartlett ($P < 0,05$). As médias foram comparadas pelo teste de Fischer para o estabelecimento e para a multiplicação foram comparadas pelos testes T ou ANOVA (dados normais) ou teste de Wilcoxon ou Kruskal-Wallis (dados não-normais) ($P < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO*

Os explantes foliares das três espécies testadas apresentaram baixa porcentagem de contaminação microbiana (inferior a 10%), no entanto, não responderam aos tratamentos com BAP ou necrosaram.

O tratamento de desinfestação utilizado foi eficiente para os explantes caulinares de *T. elegans*, sendo que não ocorreu diferença significativa da contaminação por bactérias e fungos (Teste de Fischer, $P>0,05$). Os dados das tabelas 2 demonstraram uma alta porcentagem de sobrevivência (acima de 90%) de *T. elegans*, independente do tipo de explante (Tabela 2).

TABELA 2 – PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO MICROBIANA, DE SOBREVIVÊNCIA E RESPOSTA DE BROTAÇÕES DE *Trichilia elegans*, APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MS.

EXPLANTE	BACTÉRIA (%)	FUNGO (%)	SOBREVIVÊNCIA (%)	EXPLANTES COM BROTOS (%)	Nº MÉDIO DE BROTOS
Brotação apical	2,00 A	6,00 A	92,00 A	90,50	1,10
Segmento caulinar	1,67 A	6,67 A	91,67 A	66,25	1,93

Médias com letras iguais nas colunas não diferem significativamente pelo Teste de Fischer ($P>0,05$).

Os segmentos nodais de *T. pallida* apresentaram contaminação fúngica (35,55%) superior à das brotações apicais e 11,11% de necrose e consequentemente a porcentagem de sobrevivência das brotações apicais foi mais elevada (Tabela 3, Teste de Fischer, $P\leq 0,05$.)

TABELA 3 – PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO MICROBIANA, DE NECROSE, DE SOBREVIVÊNCIA E RESPOSTA DE BROTAÇÕES DE *Trichilia pallida*, APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MS.

EXPLANTE	BACTÉRIA (%)	FUNGO (%)	NECROSE (%)	SOBREVIVÊNCIA (%)	EXPLANTES COM BROTOS (%)	Nº MÉDIO DE BROTOS
Brotação apical	4,17 A	4,17 B	0,00	91,66 A	95,83	1,00
Segmento caulinar	11,11 A	35,55 A	11,11	42,23 B	78,67	1,42

Médias com letras iguais nas colunas não diferem significativamente pelo Teste de Fischer ($P>0,05$).

Os explantes de *T. casaretti*, após o mesmo tratamento de desinfestação utilizado para as outras espécies (0,05% de HgCl₂, durante 10 minutos), foram inoculados também em meio MS, sem e com adição de BAP para verificar se a citocinina poderia acelerar a indução de maior número de brotos. A porcentagem de fungos obtida em todos os tratamentos foi baixa (menor de 10%) para brotos apicais e a mais alta foi de 20% para os segmentos nodais, cultivados em meio sem regulador vegetal. A contaminação por bactérias variou entre 8,00 e 25,92% (Tabela 4). A porcentagem de necrose mais alta (20%) ocorreu com segmentos caulinares cultivados no meio com maior concentração de BAP (4 µM). A porcentagem de explantes com brotos foi de 100%, independente do tipo de explante e da adição ou não de BAP e o número médio de brotos foi maior para os segmentos caulinares (Tabela 4).

TABELA 4 – PORCENTAGEM DE CONTAMINAÇÃO MICROBIANA, DE NECROSE, DE SOBREVIVÊNCIA E RESPOSTA DE BROTAÇÕES DE *Trichilia casaretti*, APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MS COM 0, 1, 2 E 4 µM DE BAP.

EXPLANTE/ CONCENTRAÇÃO DE BAP (µM)	BACTÉRIA (%)	FUNGO (%)	NECROSE (%)	SOBREVIVÊNCIA (%)	Nº MÉDIO DE BROTOS
Brotação apical					
0	14,81	3,70	3,70	77,78	1,03
1	25,92	3,70	3,70	77,78	1,70
2	25,92	7,40	0,00	70,37	1,59
4	14,81	7,40	3,70	77,78	1,66
Segmento caular					
0	12,00	20,00	4,00	68,00	1,84
1	12,00	8,00	8,00	72,00	2,16
2	24,00	12,00	4,00	60,00	2,08
4	8,00	8,00	20,00	68,00	1,88

5.2 INDUÇÃO E REGENERAÇÃO DE BROTOS

Os brotos apicais e segmentos caulinares das três espécies testadas apresentaram 100% de explantes com brotos, tanto no cultivo inicial, como nos subcultivos.

No cultivo inicial, *T. elegans* apresentou diferença significativa entre os tipos de explante utilizados para a variável de número médio de brotos, sendo maior (3,75) em brotações apicais (Teste T, $P \leq 0,05$). O comprimento médio dos brotos não variou para os explantes testados (Tabela 5).

TABELA 5 – NÚMERO E COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTO DE *Trichilia elegans*, APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MS, SUPLEMENTADO COM 2 μ M BAP.

EXPLANTE	Nº MÉDIO DE BROTO/EXPLANTE	COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTO (CM)
Brotação apical	2,08 B	1,39 A
Segmento caulinar	3,75 A	1,32 A

Médias com letras iguais nas colunas não diferem significativamente pelo Teste T ($P \leq 0,05$).

Resposta semelhante foi obtida para segmento caulinar de *T. pallida*, com maior número médio de brotos (2,50), quando comparado com o da brotação apical (Teste T, $P \leq 0,05$). O comprimento médio dos brotos também variou significativamente, com o melhor resultado obtido para brotação apical (1,82 cm) (Tabela 6, Teste T, $P \leq 0,05$).

TABELA 6 – NÚMERO E COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTO DE *Trichilia pallida*, APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MS, SUPLEMENTADO COM 2 μ M BAP.

EXPLANTE	Nº MÉDIO DE BROTO/EXPLANTE	COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTO (CM)
Brotação apical	1,42 B	1,82 A
Segmento caulinar	2,50 A	1,16 B

Médias com letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo Teste T ($P \leq 0,05$).

Os explantes de *T. casaretti*, inicialmente estabelecidos *in vitro* em meio com BAP, apresentaram maiores números médios de brotos. As melhores respostas ocorreram com os brotos apicais e segmentos nodais vindos do meio acrescido de 4 μ M (2,87 e 2,97, respectivamente) (Tabela 7). O comprimento médio dos brotos variou pouco para os dois tipos de explantes, independente do meio com adição de BAP, sendo que, o segmento apical cultivado em meio com 1 μ M de BAP apresentou a maior média (1,93 cm) (Tabela 7). Porém, observou-se que embora os explantes formassem mais brotos com essa concentração, alguns formavam tufo e eram pequenos, como pode ser observado na figura 3C.

TABELA 7 – NÚMERO E COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTO DE *Trichilia casaretti*, APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM MEIO MS, SUPLEMENTADO COM 1 μ M BAP.

EXPLANTE/ CONCENTRAÇÃO DE BAP NO ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> (μ M)	Nº MÉDIO DE BROTO/EXPLANTE	COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTO (CM)
Brotação apical		
0	1,05	1,56
1	2,20	1,93
2	1,87	1,87
4	2,87	1,64
Segmento nodal		
0	1,25	1,75
1	1,82	1,66
2	1,67	1,66
4	2,97	1,74

A análise do primeiro subcultivo dos explantes de *T. elegans*, cultivados em meio com 0, 1 e 2 μ M de BAP, indicou que com adição de BAP aumentou o número médio de brotos apesar da diferença não ter sido significativa (Teste Kruskal-Wallis, $P > 0,05$). A melhor resposta ocorreu com 2 μ M de BAP (3,23) (Tabela 8, Figuras 3D, 3E e 3F). No entanto, o comprimento médio da parte aérea foi semelhante nos tratamentos testados (Tabela 8).

TABELA 8 – NÚMERO E COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTO DE *Trichilia elegans*, APÓS 30 DIAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO, EM MEIO MS, SEM OU COM ADIÇÃO DE 1 E 2 μ M BAP.

CONCENTRAÇÃO DE BAP (μ M)	Nº MÉDIO DE BROTO/EXPLANTE	COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTO (CM)
0	1,67 A*	1,37 A**
1	2,57 A*	1,45 A**
2	3,23 A*	1,38 A**

*Médias com letras iguais nas colunas não diferem significativamente pelo Teste de Kruskal-Wallis ou **ANOVA ($P > 0,05$).

O primeiro subcultivo dos explantes de *T. pallida*, cultivados em meio MS, contendo 2 μ M de BAP, demonstrou um aumento no número de brotos, quando comparado com o dos explantes do cultivo inicial. Além disso, o número médio de brotos foi significativamente maior para os segmentos nodais que atingiram a média de 4,33 brotos por explante (Figura 3H e 3I), quando comparado com 1,18 brotos dos segmentos apicais (Figura 3G, Teste de Wilcoxon, $P \leq 0,05$). O comprimento médio da parte aérea não variou entre os explantes testados (Tabela 9, Teste T, $P > 0,05$).

TABELA 9 – NÚMERO E COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTO DE *Trichilia pallida*, APÓS 30 DIAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO, EM MEIO MS, COM ADIÇÃO DE 2 µM BAP.

EXPLANTE	Nº MÉDIO DE BROTO/EXPLANTE	COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTO (CM)
Brotação apical	1,18 B*	1,55 A**
Segmento nodal	4,33 A*	1,52 A**

*Médias com letras diferentes na coluna diferem significativamente pelo Teste Wilcoxon ($P < 0,05$).

**Médias com letras iguais na coluna não diferem significativamente pelo Teste T ($P > 0,05$).

A análise estatística do segundo subcultivo de *T. pallida* indicou que não houve diferenças significativas entre as concentrações de BAP utilizadas para nenhuma das variáveis testadas. Tanto o número médio de brotos, como também o comprimento médio da parte aérea variou pouco entre os explantes, independente da adição de BAP (Tabela 10). Entretanto, ocorreu um aumento na porcentagem de necrose que foi o dobro nos explantes (36%) cultivados no meio com BAP. Nesse subcultivo, não foi comparado o tipo de explante.

TABELA 10 – NÚMERO E COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTO DE *Trichilia pallida*, APÓS 30 DIAS DO SEGUNDO SUBCULTIVO EM MEIO MS, SEM OU COM 1 µM DE BAP.

CONCENTRAÇÃO DE BAP (µM)	Nº MÉDIO DE BROTO/EXPLANTE	COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTO (CM)
0	2,16 A	1,14 A
1	2,39 A	1,21 A

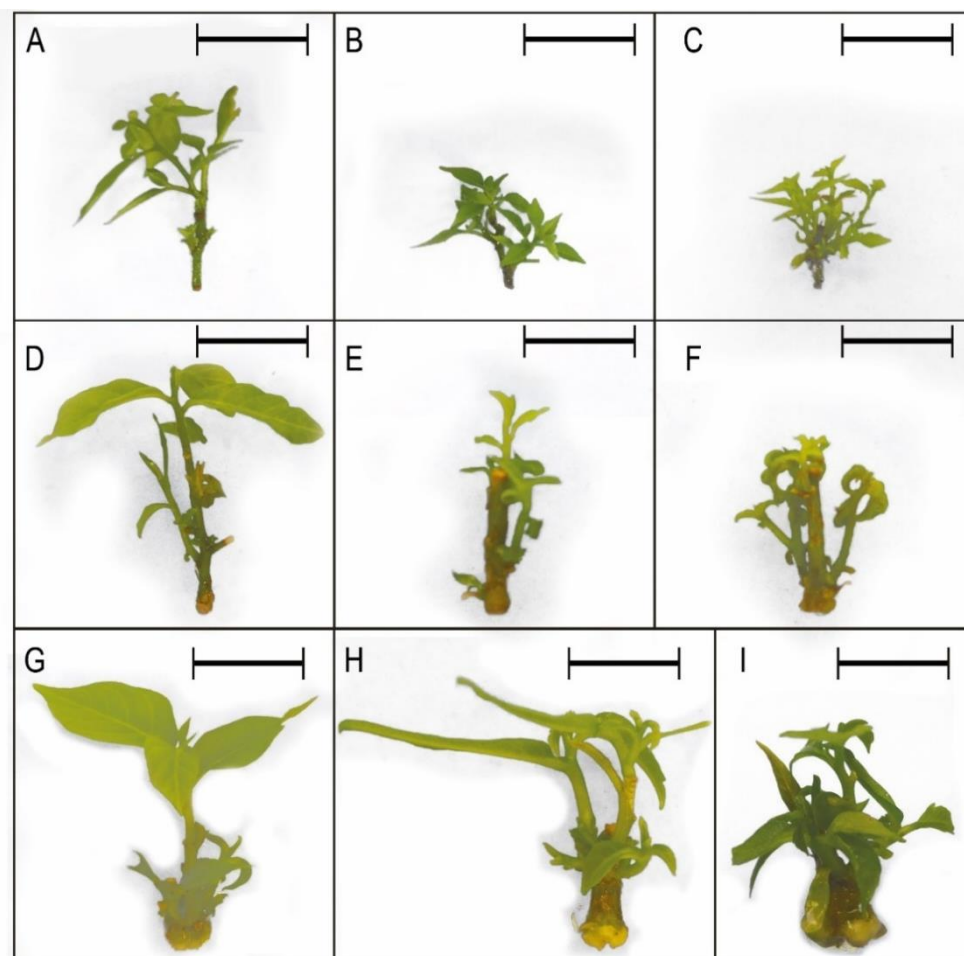
Médias com letras iguais nas colunas não diferem significativamente pelo Teste T ($P > 0,05$).

As respostas de regeneração de brotos de *T. casaretti* obtidas no primeiro subcultivo foram inferiores às do cultivo inicial. Os maiores números médios dos brotos apicais de *T. casaretti* ocorreram com explantes vindos do meio com 4 µM de BAP na etapa de estabelecimento *in vitro* (2,20). No entanto, para os segmentos nodais, a melhor resposta ocorreu para os explantes vindos do meio com 1 µM de BAP (2,22) (Figura 3B). O comprimento médio dos brotos foi semelhante para os dois tipos de explantes testados, como observado no cultivo inicial (Tabela 11). A análise do primeiro subcultivo revelou que os explantes apicais e nodais vindos do meio MS com 4 µM de BAP, apresentaram maior número médio de brotos e menor comprimento médio da parte aérea (Tabela 11, Figuras 3A, 3B e 3C).

TABELA 11 - NÚMERO E COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTO DE *Trichilia casaretti*, APÓS 30 DIAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO EM MEIO MS, COM ADIÇÃO DE 2 μ M BAP.

EXPLANTE/ CONCENTRAÇÃO DE BAP DO ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> (μ M)	Nº MÉDIO DE BROTO/EXPLANTE	COMPRIMENTO MÉDIO DE BROTO (CM)
Brotação apical		
0	1,00	1,37
1	1,80	1,39
2	1,42	1,42
4	2,00	1,19
Segmento nodal		
0	1,11	1,39
1	2,22	1,46
2	1,25	1,48
4	1,25	1,34

FIGURA 3 – RESPOSTAS DE REGENERAÇÃO DE BROTO, APÓS 30 DIAS DO PRIMEIRO SUBCULTIVO EM MEIO DE CULTURA MS COM ADIÇÃO DE 2 μ M DE BAP (*Trichilia elegans* E *Trichillia pallida*) OU 1 μ M DE BAP (*Trichilia casaretti*) A) BROTAÇÃO APICAL DE *T. casaretti*, B) SEGMENTO NODAL DE *T. casaretti* E C) BROTO EM TUFO DE *T. casaretti*; D) BROTAÇÃO APICAL DE *T. elegans*, E) SEGMENTO NODAL DE *T. elegans* E F) BROTO EM TUFO *T. elegans*; G) BROTAÇÃO APICAL DE *T. pallida*, H) SEGMENTO NODAL DE *T. pallida* E I) BROTO EM TUFO *T. pallida*.



FONTE: A autora (2020).
Barras =1 cm.

6. DISCUSSÃO

O levantamento bibliográfico sobre micropropagação de espécies de Meliaceae indicou que as espécies que apresentaram mais estudos até o momento são as de maior valor econômico, como: *A. indica*, *C. fissilis*, *M. azedarach* e *S. macrophylla*. A preferência de estudos com tais espécies pode ter sido porque essas são intensamente exploradas em seu ambiente, devido às qualidades de sua madeira e necessitam com urgência do desenvolvimento de tecnologias que possam ajudar na sua manutenção e conservação na natureza e ao mesmo tempo permitam sua utilização comercial de maneira sustentável.

Estudos com micropropagação de *T. elegans* e *T. casaretti* são inexistentes e com *T. pallida* foi estabelecido um protocolo recente de produção de mudas a partir de material juvenil (PRIM et al., 2020), que serviu de base para a instalação de experimentos com as três espécies. Para outras espécies de *Trichilia*, estudos com micropropagação também são escassos, por isso, foi realizada a revisão bibliográfica da família Meliaceae.

As culturas de *T. elegans*, *T. pallida* e *T. casaretti* foram estabelecidas *in vitro* com sucesso utilizando explantes caulinares juvenis e regeneraram brotos por organogênese direta. Para muitas espécies lenhosas, a etapa de desinfestação é limitante devido às elevadas porcentagens de contaminação microbiana. O tratamento com HgCl₂ (0,05%, durante 10 minutos) foi eficiente para os explantes caulinares de *T. elegans* e brotos apicais de *T. pallida*, sendo obtidas porcentagens de sobrevivência superiores à 90%, enquanto que para os explantes de *T. casaretti* foi de aproximadamente 70%. Embora outras substâncias possam ser utilizadas como agentes desinfestantes, o estabelecimento de *T. catigua* e *T. pallida* em estudos anteriores só foi possível com o tratamento dos explantes com cloreto de mercúrio (VALMORBIDA, 2007; PRIM et al., 2020)

Os segmentos caulinares de *T. pallida* apresentaram as maiores porcentagens de contaminação microbiana (11,11 e 35,55% de bactérias e fungos) e isso pode ter sido ocasionado pelo fato dos explantes se localizarem na região basal da plântula, próximo ao substrato.

Essa dificuldade de desinfestação de segmentos caulinares de outra espécie de *Trichilia* (*T. catigua*) já havia sido relatada por Valmorbida (2007). Para essa espécie foram realizados vários experimentos de desinfestação utilizando etanol, hipoclorito de sódio e cálcio, HgCl_2 , fungicidas e antibióticos, em diferentes concentrações, tempos de exposição e também combinações de agentes desinfestantes. A maior porcentagem de sobrevivência de *T. catigua* foi obtida com imersão em solução de 0,05% de HgCl_2 durante cinco minutos, seguida de solução de hipoclorito de sódio 1,5% durante 15 minutos e com adição do antibiótico rifampicina obteve-se 84,17% de sobrevivência e sem antibiótico 55,36% (VALMORBIDA, 2007).

No presente estudo foram obtidas elevadas porcentagens de sobrevivência para as espécies de *Trichilia* (60 a 90%), utilizando só um agente desinfestante. No entanto, as pulverizações com fungicida Cercobin® e a adição de 0,1% de PPM® no meio de cultura devem ter contribuído para reduzir a porcentagem de contaminação microbiana. Esse procedimento de pulverizações com Cercobin® e adição de PPM no meio MS, já havia sido recomendado para *T. pallida* na desinfestação de sementes. A diferença consistiu no período de exposição do HgCl_2 que para as sementes ocorreu em 15 minutos (PRIM et al., 2020), com 34,67% de contaminação microbiana em sementes utilizadas para germinação *in vitro* e 50,67% para as sementes germinadas *ex vitro* (PRIM et al., 2020).

Neste estudo, devido à maior sensibilidade dos explantes caulinares, quando comparados com à das sementes, o tempo de exposição foi 10 minutos. Segundo Singh (2018), a desinfestação com solução de 0,1% de HgCl_2 durante dois minutos vem sendo eficiente para muitas espécies. Sendo assim, constatou-se que a concentração e o tempo de exposição ao HgCl_2 podem variar conforme o explante e a espécie utilizada não se mostrando tóxico de modo geral. Resultado semelhante foi obtido para o estabelecimento de culturas assépticas e outras etapas do cultivo *in vitro* de *Campomanesia xanthocarpa* (Myrtaceae), para a qual a adição de 0,1% de PPM inibiu a contaminação bacteriana endofítica (MACHADO et al., 2020).

Dos explantes testados, os foliares (segmentos do pecíolo e do limbo) não foram eficientes, pois ocorreu necrose e não regeneraram brotações, em meios de cultura suplementados com BAP (1 a 8 μM). Bastos et al. (2005)

também não obtiveram nenhuma resposta organogenética nos cultivos *in vitro* de folhas de *C. montana*. Isso pode ter ocorrido porque as folhas necessitam passar por um processo de desdiferenciação celular para a formação de brotos, pois não apresentam gemas pré-existentes. As concentrações de BAP testadas, no presente estudo, provavelmente não foram suficientes para estimular a desdiferenciação celular e induzir brotações adventícias em folhas e pecíolos. Além disso, outras citocininas podem ser mais eficientes e devem ser testadas em estudos posteriores, como o TDZ, que se mostrou eficaz para a indução de brotações em pecíolos de *T. ciliata* (DAQUINTA et al., 2000).

Brotações apicais e segmentos caulinares foram explantes responsivos para as três espécies estudadas. Segundo Singh (2018), esses explantes são recomendados para o estabelecimento *in vitro* e para estimular o crescimento e isso também foi observado para *C. fissilis* (ARAGÃO et al., 2016) e para a micropropagação de *T. pallida* (PRIM et al, 2020).

Além da seleção do explante apropriado, a determinação do meio de cultura também é um fator importante para qualquer técnica de micropropagação e nem sempre a mesma formulação de meio é recomendada para todas as etapas *in vitro*. No estabelecimento *in vitro* até o primeiro subcultivo, o meio MS favoreceu o desenvolvimento de brotos de *T. elegans* e *T. pallida*. No entanto, para *T. casaretti*, outra formulação pode ser mais apropriada, pois a partir do primeiro subcultivo foi aumentando a porcentagem de necrose.

O meio MS vem sendo utilizado com sucesso para outras espécies de Meliaceae, como: *C. canjerana* (ROCHA et al., 2007), *C. fissilis* (ARAGÃO et al., 2016) e *T. pallida* (PRIM et al., 2020). Este meio é o mais utilizado em cultura de tecidos e caracteriza-se por apresentar altas concentrações de nitrogênio nas formas de amônio e nitrato (PHILLIPS e GARDA, 2019). Para algumas espécies, não é recomendado por possuir altos níveis do íon amônio, ocasionando toxidez e isso pode ter ocorrido para *T. casaretti*. Uma alternativa para essa espécie seria testar o WPM, que é recomendado para plantas lenhosas e tem menos nitrogênio total e amônio, quando comparado com o MS (PHILLIPS e GARDA, 2019). Esse meio foi recomendado para *Luehea divaricata* (FLORES et al., 2011).

Outro fator importante na micropropagação é a escolha do regulador vegetal e da concentração ótima que varia conforme a etapa e a espécie. Para regeneração de brotações, as citocininas são mais utilizadas e BAP é uma das mais eficientes. Isso foi constatado para a indução de brotos das três espécies, tanto para as brotações apicais, como segmentos caulinares.

No cultivo inicial, os segmentos caulinares de *T. elegans* e *T. pallida* apresentaram resultados significativamente superiores para os números médios de brotos, quando comparados com os brotos apicais. A retirada da gema apical ocasionou o desenvolvimento de brotos laterais, sendo esse efeito promovido pela adição de BAP. O comprimento médio dos brotos apicais de *T. pallida* foi superior ao dos segmentos nodais. A partir do segundo subcultivo, o explante não interferiu nem na regeneração de brotações e nem no comprimento médio de brotos.

Para a multiplicação de *T. elegans* e *T. pallida*, a adição de 2 μ M BAP ao meio MS aumentou o número de brotos, após primeiro subcultivo (3,23 e 4,33, respectivamente), enquanto não interferiu no comprimento médio da parte aérea. Essa concentração de BAP já havia sido recomendada para *T. pallida* (PRIM et al., 2020). Aragão et al. (2016) também constatou que a suplementação de BAP é necessária para aumentar o número de brotos por explante de segmentos apicais e nodais de *C. fissilis*, recomendando 2,5 μ M.

T. casaretti foi a única espécie desse estudo que foi estabelecida *in vitro* em meio MS, com adição de BAP. Os explantes caulinares apresentaram melhor resposta, quando estabelecidos *in vitro* em meio contendo 4 μ M de BAP e transferidos para meio com 1 μ M de BAP no cultivo inicial (2,97). No entanto, os subcultivos sucessivos foram reduzindo o número médio de brotos dos explantes cultivados inicialmente em meio com 2 e 4 μ M de BAP, exceto para os explantes nodais estabelecidos em meio com adição de 1 μ M. As maiores concentrações de BAP podem ter inibido a formação de brotos, além de ocasionar maiores porcentagens de necrose. Resultado semelhante foi obtido com *T. pallida*, para a qual ocorreu inibição de formação de brotos no terceiro subcultivo, com adição de concentração mais elevada de BAP (8 μ M) (PRIM et al, 2020). Com isso, constatou-se que a concentração ótima de BAP pode variar conforme a espécie e também depende do estado fisiológico dos explantes. Prim et al. (2020) podem ter obtidos melhores respostas de

regeneração de brotos de *T. pallida* porque utilizaram explantes de plântulas recém germinadas, enquanto que no nosso estudo, a coleta foi realizada após seis meses de manutenção das plantas na casa de vegetação.

Apesar de ter ocorrido um aumento no número de brotos no cultivo inicial de *T. casaretti*, a adição de BAP no estabelecimento *in vitro* pode ter ocasionado maiores porcentagens de necrose já a partir do primeiro subcultivo. A necrose obtida em explantes de *T. casaretti*, além de poder ter sido ocasionada pelo meio MS e /ou pela adição de BAP em subcultivos sucessivos pode ser devido ao acúmulo de etileno no frasco, com as tampas vedadas com plástico filme. Flores et al. (2012) diminuiu a senescência dos brotos de *C. odorata*, ao usar tampas que permitiam maior ventilação, o que possivelmente reduziu o acúmulo de etileno, hormônio gasoso que induz a senescência vegetal, na atmosfera dos frascos. A adição de substâncias absorventes ou antioxidantes como: carvão ativado, ácido cítrico e ácido ascórbico também diminuíram a oxidação de explantes de *Schizolobium amazonicum* e *Cordia trichotoma* (CORDEIRO et al., 2004; HERBELE, 2010).

No presente estudo, os brotos de *T. casaretti* iniciaram o processo de senescência, perdendo as folhas e ficando amarelados, mesmo com a redução da concentração de BAP ou a mudança do meio MS para MS/2, meio com concentrações de nutrientes reduzida pela metade, os brotos não se recuperaram. Cuidados na manipulação do explantes, redução da intensidade luminosa e intervalos menores entre os subcultivos também são práticas que podem reduzir a oxidação dos explantes (OLIVEIRA et al., 2013). Sendo assim, são necessários mais estudos para determinar a principal causa da necrose em explantes de *T. casaretti*.

7. CONCLUSÕES

O estudo realizado trouxe algumas contribuições para o entendimento do comportamento de *T. casaretti*, *T. elegans* e *T. pallida* durante o estabelecimento de culturas *in vitro* e indução e regeneração de brotos.

Foram estabelecidas culturas assépticas das três espécies e o tratamento de desinfestação mostrou-se eficiente no controle de contaminações fúngicas e bacterianas, permitindo elevadas porcentagens de sobrevivência.

Brotações apicais e segmentos nodais foram explantes responsivos para a técnica de multiplicação de gemas axilares enquanto os explantes foliares não apresentaram respostas.

A adição de BAP aumentou a indução de brotos e a melhor concentração variou conforme a espécie. Para a multiplicação de *T. elegans* e *T. pallida* é recomendada a adição de 2 µM de BAP ao meio MS, enquanto que para *T. casaretti*, 4 µM de BAP no meio de estabelecimento *in vitro*, seguido de 1 µM de BAP, no cultivo inicial.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Visando a otimização da regeneração de brotos das espécies investigadas constatou-se que são necessários mais estudos sobre a micropropagação de *T. casaretti*, *T. elegans* e *T. pallida*, realizando mais subcultivos com diferentes citocininas ou testando a combinação de citocininas e auxinas. Também poderão ser testadas outras formulações de meio de cultura, com a adição ou não de agentes antioxidantes.

REFERÊNCIAS

ALBANESE, A. **Controle de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: curculionidae) em variedades de milho crioulo com uso de plantas inseticidas**. 2010. 56 f. Dissertação (mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.uel.br/document/?code=vtls000162546>>. Acesso em: 21 set. 2020.

ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C. V.; GRANER, E. M.; BRONDANI, G. E.; ABREU-TARAZI, M. F. Pre-procambial cells are niches for pluripotent and totipotent stem-like cells for organogenesis and somatic embryogenesis in the peach palm: a histological study. **Plant Cell Reports**. v. 31, n. 8, p. 1495 -1515, 2012. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00299-012-1264-6>>. Acesso em: 10 nov. 2020.

ARAGÃO, V. P. M.; RIBEIRO, Y. R. de S., REIS, R. S., MACEDO, A. F., FLOH, E. I. S., SILVEIRA, V., SANTA-CATARINA, C. In vitro organogenesis of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae): the involvement of endogenous polyamines and carbohydrates on shoot development. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 124, n. 3, p. 611 – 620, mar. 2016. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-015-0919-8#citeas>>. Acesso em: 10 nov. 2020.

ARORA, K.; SHARMA, M.; SRIVASTAVA, J.; RANADE, S. A.; SHARMA, A. K. In vitro cloning of *Azadirachta indica* from root explants. **Biologia Plantarum**. v. 55, n. 1, p. 164 – 168, 2011. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s10535-011-0023-9>>. Acesso em: 10 nov. 2020.

BASSAN, J. S.; REINIGER, L. R. S.; ROCHA, B. H. G.; SEVERO, C. R. P.; FLÔRES, A. V. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.). **Ciência Florestal**. v. 16, n. 4, p. 381-390, 2006. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/27790621_Oxidacao_fenolica_tipo_de_explante_e_meios_de_cultura_no_estabelecimento_in_vitro_de_canafistula_Peltophorum_dubium_Spreng_Taub>. Acesso em: 10 nov. 2020.

BASSEGIO, C.; FOGAÇA, L. A.; BALTAZAR, P.; EMMEL, E. Desenvolvimento de Ipê-roxo em meios de cultura e concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) durante a etapa de multiplicação *in vitro*. **Acta Iguazu**. v. 6, n. 1, p. 72 – 80, 2017. Disponível em: <http://saber.unioeste.br/index.php/actaiguazu/article/view/16878>. Acesso em: 10 nov. 2020.

BASTOS.; SERRANO, C.; JARAMILLO, E. H. de. Effects of donor plant age and explants on *in vitro* culture of *Cedrela montana* Moritz ex Turcz. **Universitas Scientiarum**. v. 17, n. 3, p. 263 – 271, nov. 2011. Disponível em: < http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832012000300002>. Acesso em: 10 nov. 2020.

BARZOTTO, I. L. M. **Atividade inseticida de extratos vegetais sobre *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer & Trelles, 1917) (Hemíptera: Psyllidae)**. 2010. 60 f. Dissertação (mestrado em Engenharia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2010. Disponível em: <<http://tede.unioeste.br/handle/tede/2795#preview-link0>>. Acesso em: 21 set. 2020.

BORGONI, P. C.; VENDRAMIM, J. D. Efeito Subletal de Extratos Aquosos de *Trichilia* spp. Sobre o Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em Milho. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 2, p. 311 - 317, mar./abr. 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-566X2005000200020&script=sci_abstract&tlng=pt >. Acesso em: 06 mar. 2020.

BOTIN, A. A.; CARVALHO, A. de. Reguladores de crescimento na produção de mudas florestais. **Revista de Ciências Agroambientais**. v. 13, n. 1, p. 83 – 96, 2015. Disponível em: <https://docplayer.com.br/5340484-Artigo-de-revisao-reguladores-de-crescimento-na-producao-de-mudas-florestais.html>. Acesso em: 10 nov. 2020.

CAMPOS, E. P. de. **Fenologia e chuva de sementes em Floresta Estacional Semidecidual no município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil**. 2007. 50 f. Tese (doutorado em Botânica), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007. Disponível em <<https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/376>>. Acesso em: 01 out. 2020.

CNCFlora. *Trichilia casaretti*. In:_____, **Lista Vermelha da flora brasileira**, versão 2012.2. Disponível em <<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Trichilia%20casaretti>> Acesso em: 05 mar. 2020.

CORDEIRO, I. M. C. C.; LAMEIRA, O. A.; OHASHI, S. T.; ROSAL, L. F. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke. **Cerne**. v. 10, n. 1, p. 118-124, 2004. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/85819/1/v10-n1-nt-01.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2020.

DAQUINTA, M.; LEZCANO, Y.; CID, M.; PINA, D.; RODRÍGUEZ, R. Morfogénese *in vitro* de *Toona ciliata* a partir de raquis de folhas jovens com tidiazuron. **Revista Colombiana de Biotecnología**. v. 7, n. 2, p. 5 – 9, dez.

2005. Disponível em: <<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/489>>. Acesso em: 10 nov. 2020.

FLORA DO BRASIL em construção 2020. *Meliaceae*. In: **Flora do Brasil 2020 em construção**, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10011>>. Acesso em: 05 mar. 2020

FLORES, A. V. REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; CUNHA, A. C. M. C. M.; GOLLE, D. P.; BASSAN, J. S. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. **Ciência Florestal**. v. 21, n. 1, p. 175-182, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1980-50982011000100175&script=sci_abstract&lng=pt>. Acesso em: 10 nov. 2020.

FLORES, J. P.; VEJA, M. E. A.; TRIPEPI, R. R. Assays for the *in vitro* establishment of *Swietenia macrophylla* and *Cedrela odorata*. **Revista Colombiana de Biotecnología**. v. 14, n. 1, p. 20 – 30, jul. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752012000100003>. Acesso em: 10 nov. 2020.

FONSECA, S. C. L.; FREIRE, H. B. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. **Bragantia**, v. 62, n. 2, p. 297-303, abr. 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0006-87052003000200016>. Acesso em: 14 set. 2020.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experiment Cell Research**. v. 50, n. 1, p. 151 –158, 1968.

GARCEZ, F.; GARCEZ, W. S.; ROQUE, N. F.; CASTELLANO, E. E.; SHPECTOR, J. 7Beta-oxygenated limonoids from *Trichilia elegans* ssp. *Elegans*. **Phytochemistry**. v. 55, n. 7, p. 733 – 740. 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11190389/>. Acesso em: 15 nov. 2020.

GARCÍA-GONZÁLES, R.; DELGADO, M.; GONZÁLEZ, Y.; GONZÁLEZ, A.; GARRIGA, M.; CALIGARI, P. D. S.; CARRASCO, B.; QUIROZ, K. *In vitro* propagation of cedar (*Cedrela odorata* L.) from juvenile shoots. **Chilean Journal of Agricultural Research**. v. 71, n. 3, p. 376 – 382, set. 2011. Disponível em: <https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0718-58392011000300005&lng=es&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 10 nov. 2020.

GUPTA, N.; JAIN, V.; JOSEPH, M. R.; DEVI, S. A review on micropropagation culture method. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**. v.8, p. 86-93, 2020.

HALIZA, I.; FAUZI, M. S. A.; SUHAILA, A. R. S.; HASNIDA, H. N.; NAZIRAH, A.; FUAD, Y. M. *In vitro* propagation of *Khaya ivorensis* from coppiced shoots. **Journal of Tropical Forest Science**. v. 26, n. 2, p. 298 – 301, 2014.
Disponível em: < <https://www.frim.gov.my/v1/JTFSONline/jtfs/v26n2/298-301.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2020.

HEBERLE, M. **Propagação *in vitro* e *ex vitro* de louro-pardo (*Cordia trichotoma* (Vell.) Arrabida ex Steudel)**. 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

HUNG, C. D.; TRUEMAN, S. J. *In vitro* propagation of the African mahogany *Khaya senegalensis*. **New Forests**. v. 42, p. 117 – 130, 2011. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s11056-010-9241-9>>. Acesso em: 10 nov. 2020.

HUSAIN, M. K.; ANIS, M. Rapid *in vitro* multiplication of *Melia azedarach* L. (a multipurpose woody tree). **Acta Physiologia e Plantarum**. v. 31, p. 765 – 772, mar. 2009. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-009-0290-7>>. Acesso em: 10 nov. 2020.

ILIEV, I., GAJDOSOVÁ, A.; LIBIAKOVÁ, G.; JAIN, S. M. Plant micropropagation. In: DAVEY, M. R.; ANTHONY, P. (Eds.) **Plant cell culture: essential methods**. John Wiley & Sons, 2010. pp. 1-23.

KLEIN, R. M. **Meliáceas**. Flora Ilustrada Catarinense, 1984. 138p.

LIEW, T. K.; TEO C. K. H. Multiple shoot production *in vitro* of the Tropical Timber Tree, Sentang. **HortScience**. v. 33, n. 6, p. 1073 – 1075, 1998.
Disponível em: <https://journals.ashs.org/hortsci/downloadpdf/journals/hortsci/33/6/article-p1073.xml>. Acesso em: 10 nov. 2020.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (*Kalmia latifolia*), by use of shoot tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagator's Society**. n. 30, p. 421-427, 1981.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. v. 02, 2 ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992. Disponível em: <<https://docero.com.br/doc/5801ev>>. Acesso em: 05 mar. 2020.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. v. 03, 1 ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2009. Disponível em: <https://www.academia.edu/32943874/Arvores_Brasileiras_Lorenzi_volume_3>. Acesso em: 02 mar. 2020.

MABBERLEY, D. J. Meliaceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). **The Families and Genera of Vascular Plants**: flowering plants eudicot, Sapindales, Curcubitales, Myrtaceae, v. X, Springer, p. 185 – 211, 2011. Disponível em: <encurtador.com.br/xKRST>. Acesso em: 28 fev. 2020.

MATOS, A. P.; NEBO, L.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. da G. F. da; RODRIGUES, R. R. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* E *T. catigua* (Meliaceae). **Química Nova**. v. 32, n. 6, p. 1553 – 1556, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000600037&lng=pt&nrm=iso&tling=pt>. Acesso em: 15 nov. 2020.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.1, p.437 - 497, 1962.

OLIVEIRA, L. S. de; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**. v. 33, n. 76, p. 439 – 453, 2013. Disponível em: <https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/481>. Acesso em: 10 nov. 2020.

OSENI, O. M.; PANDEL, V.; NAILWAL, T. K. A Review on Plant Tissue Culture, A Technique for Propagation and Conservation of Endangered Plant Species. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v. 7, p. 3778 - 3786, 2018. Disponível em: <<https://www.ijcmas.com/7-7-2018/Ojo%20Michael%20Oseni,%20et%20al.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2020.

PARITALA, V.; CHIRUVELLA, K. K.; THAMMINENI, C.; GHANTA, R. G.; MOHAMMED, A. Phytochemicals and antimicrobial potentials of mahogany family. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 25, p. 61 – 83, 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1016/j.bjp.2014.11.009>>. Acesso em: 15 nov. 2020.

PASTORE, J. A. Meliaceae. In: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M.; MELHEM, T. S. A. (Ed.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. v. 3. São Paulo: FAPESP: RiMa, 2003, p. 225 – 240. Disponível em: <https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/institutodebotanica/wp-content/uploads/sites/235/2016/06/FFESP-Volume-III_06_24.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2020.

PATÍÑO, M. C.; MORÁN, H. R.; SILVA, W. M.; FALQUEZ, O. C.; TROYA, A. E.; ARÉVALO, M. C.; RODRÍGUEZ, J. N.; CARRIEL, J. M. Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (caoba). **Ciencia y Tecnología**. v. 6, n. 2, p 1 – 8, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/283514154_PROPAGACION_CLONAL_in_vitro_DE_Swietenia_macrophylla_King_CAOBA>. Acesso em: 10 nov. 2020.

PATRÍCIO, P. C.; CERVI, A. C. O gênero *Trichilia* P. Browne (Meliaceae) no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Biológica Paranaense**., Curitiba, v. 34, p. 27 – 71, 2005. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/acta/article/view/953>> . Acesso em: 02 mar. 2020.

PENNINGTON, T. D. Systematic Treatment of American *Trichilia* (Meliaceae). In: PENNINGTON, T. D.; CLARKSON, J. J. (Ed.) **A revision of American *Trichilia* (Meliaceae)**. Phytotaxa, Auckland, v. 259, n. 1, 2016, p. 18 – 162. Disponível em: <<https://www.mapress.com/j/pt/article/view/phytotaxa.259.1.1/5692>>. Acesso em: 28 fev. 2020.

PHILLIPS, G. C.; GARDA, M. Plant tissue culture media and practices: an overview. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. v. 55, p.242-257, 2019.

PITTA, R. M.; VENDRAMIN, J. D.; FERREIRA, C. **Phagodeterrent effect of *Trichilia pallida* extract against *Rhopalosiphum maidis***. Piracicaba: Esalq, 2011. Hemipteran-Plant Interactions Symposium. Resumo em Anais de Congresso. Disponível em: <<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=906911&biblioteca=vazio&busca=906911&qFacets=906911&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>>. Acesso em: 21 set. 2020.

PRIM, P. de S.; OLIVEIRA, L. F. de; RIBAS, L. L. F. An efficient protocol for *in vitro* propagation of *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae): a potential tree for natural insecticide production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-020-01958-4#citeas>>. Acesso em: 28 out. 2020.

RAM, B.; RATHORE, T. S.; BOPANNA, B. D. An efficient protocol for micropropagation and genetic stability analysis of *Melia dubia* Cav. - an important multipurpose tree. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v. 3, n. 7, p. 533 – 544, 2014. Disponível em: <<https://www.ijcmas.com/vol-3-7/Bhimi%20Ram,%20et%20al.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2020.

ROCHA, S. C. da; QUORIM, M.; RIBAS, L. L. F.; KOEHLER, H. S. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore**. v. 31, n. 1, p. 43 – 50, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-67622007000100006>. Acesso em: 10 nov. 2020.

RODRIGUES, M.; COSTA, T. H. F.; FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Effects of flask sealing and growth regulators on in vitro propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. v. 48, n. 1, p. 1 – 6, jan. 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/216874876_Effects_of_flask_sealing_and_growth_regulators_on_in_vitro_propagation_of_neem_Azadirachta_indica_A_Juss>. Acesso em: 10 nov. 2020.

RODRIGUEZ, A. P. M.; VENDRAME, W. A. Micropropagation of Tropical Woody Species. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. (Eds.) **Micropropagation of Woody Trees and Fruits**. Springer, 2003. p. 153 – 180.

ROSSETO, V. **Aspectos da história de vida de quatro espécies de *Trichilia* (Meliaceae) na Reserva de Santa Genebra, Campinas (SP)**. 2007. 127 f. Dissertação (mestrado em Ecologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), 2007. Disponível em <<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/316360>>. Acesso em: 14 set. 2020.

SCCOTI, M. S. V.; ARAUJO, M. M.; WENDLER, C. F.; LONGHI, S. J. Mecanismos de regeneração natural em remanescente de Floresta Estacional Decidual. **Ciência Florestal**, v. 21, n. 3, p. 459 – 472, jul./set. 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1980-50982011000300459&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 05 out. 2020.

SINGH, S. R. Review on problems and its remedy in plant tissue culture. **Asian Journal of Biological Sciences**. DOI: 10.3923/ajbs.2018. p. 1-8

SOUZA, A. P. de; VENDRAMIN, J. D. Atividade inseticida de extratos aquosos de meliáceas sobre a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotropical Entomology**. v. 30, n. 1, p. 133 - 137,

mar. 2001. Disponível em: < https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-566X2001000100019&script=sci_arttext >. Acesso em: 21 set 2020.

TAKAHASI, A.; FINA, B. G. Síndromes de dispersão de sementes de uma área do Morro do Paxixi, Aquidauana, MS, Brasil. In: Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal, IV., 2004, Corumbá. **Anais...** Corumbá: Embrapa Pantanal; [Campo Grande, MS]: UCDB: UFMS: SEBRAE-MS, 2004. Disponível em <https://www.cpap.embrapa.br/agencia/simpan/sumario/artigos/asperctos/pdf/bioticos/641RB-Takahasi-01_OKVisto.pdf>. Acesso em: 14 set. 2020.

VALMORBIDA, J. **Propagação da espécie *Trichilia catigua* A.Juss (Catiguá)**. 2007. 91. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007. Disponível em: < <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/103248> >. Acesso em: 02 mar. 2020.

VALMORBIDA, J.; BOARO, C.S.F.; LESSA, A. O.; SALERNO, A. R. Enraizamento de estacas de *Trichilia catigua* A. Juss. (catiguá) em diferentes estações do ano. **Revista Árvore**, v. 32, n. 3, p. 435 - 442, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-67622008000300006>. Acesso em: 11 mar. 2020.

VILA, S.; SCOCCHI, A.; MROGINSKI, L. Plant regeneration from shoot apical meristems of *Melia azedarach* L. (*Meliaceae*). **Acta Physiologia e Plantarum**. v. 24, n. 2, p. 195 – 199, 2002. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-002-0011-y>>. Acesso em: 10 nov. 2020.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. da. Propagação *In vitro* de Espécies Florestais. In: _____. **Silvicultura Clonal: princípios e técnicas**. 2 ed. Viçosa: Ed. UFV, 2013. p. 114 – 141.

ZIMBACH, L; MORI, E. S.; NAKAGAWA, J. Germinação da espécie recalcitrante *Trichilia pallida* Swartz na estratégia de conservação genética. **Conference: Simposio de Recursos Genéticos para América Latina e Caribe**. Bento Gonçalves: V. 10, 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/299986111_Germinacao_da_especie_e_recalcitrante_Trichilia_pallida_Swartz_na_estrategia_de_conservacao_genetica>. Acesso em: 11 mar. 2020.